



TITLE:

<総説>ケイヒ酸経路の生化学と分子生物学

AUTHOR(S):

梅澤, 俊明

CITATION:

梅澤, 俊明. <総説>ケイヒ酸経路の生化学と分子生物学. 木材研究・資料
2000, 36: 17-33

ISSUE DATE:

2000-12-20

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/51392>

RIGHT:

ケイヒ酸経路の生化学と分子生物学*

梅 澤 俊 明**

Biochemistry and Molecular Biology of Cinnamate Pathway*

Toshiaki UMEZAWA**

(平成12年 8 月31日受理)

1. 緒 言

フェニルアラニン (チロシン) からヒドロキシケイヒアルコール類に至る経路を通常ケイヒ酸経路と呼ぶ。この経路は、リグニン、リグナン、ノルリグナン、クマリンを始めとする種々のフェニルプロパノイドへ至るモノマーを与え、また、この経路内の上流部でフラボノイドやスチルベンを与える複合経路にも分岐している。従って、木化や生体防御と密接に関わっており、植物二次代謝の中でも、主要かつ最も重要な経路の1つと考えられる。

植物分子生物学におけるモデル植物、シロイヌナズナ、のゲノムの全塩基配列が本年中にも解明されようと言う昨今、植物分子生物学/分子遺伝学は爆発的な勢いで進展しつつある。リグニン生合成の化学と生化学については、Higuchi による詳細な総説¹⁾が1990年に報告されているが、樹木二次代謝研究、特にリグニン生合成の分子生物学研究はここ数年の間に急速に進展してきている。中でも、リグニン生合成に関わる *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) の機能については、1990年の半ば以降多くの新知見が得られてきた。本総説では、ケイヒ酸経路の諸酵素、特に OMT について、最近の研究を取りまとめてみたい。

2. ケイヒ酸経路

2.1 フィーディング実験による経路の概略の解明

4-ヒドロキシケイヒアルコール類であるリグニンモノマー (モノリグノール類) は、ケイヒ酸経路を通して生合成されるが、ケイヒ酸経路の研究は、常に、リグニンの化学構造の多様性 (植物種による違いや組織による違い) および他のフェニルプロパノイド系二次代謝産物の生合成と関連づけて、検討されてきた。針葉樹リグニンは、主にコニフェリルアルコール、広葉樹リグニンは、主にコニフェリルアルコールとシナピルアルコール、およびイネ科植物リグニンでは、主にコニフェリルアルコール、シナピルアルコール、4-ヒドロキシケイヒアルコール (=4-クマリルアルコール、*p*-ヒドロキシケイヒアルコール、*p*-クマリルアルコール) が重合して出来ている。よって、ケイヒ酸から見て最も官能基変換の

* 第55回木質科学研究所公開講演 (平成12年 5 月25日) において、「樹木フェノール成分の代謝工学」として講演

** 京都大学木質科学研究所木質生命科学部門生化学制御分野 (Laboratory of Biochemical Control, Division of Wood Bioscience, Wood Research Institute, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan)

Keywords : Cinnamate pathway, Biosynthesis, Lignin, Phenylpropanoid

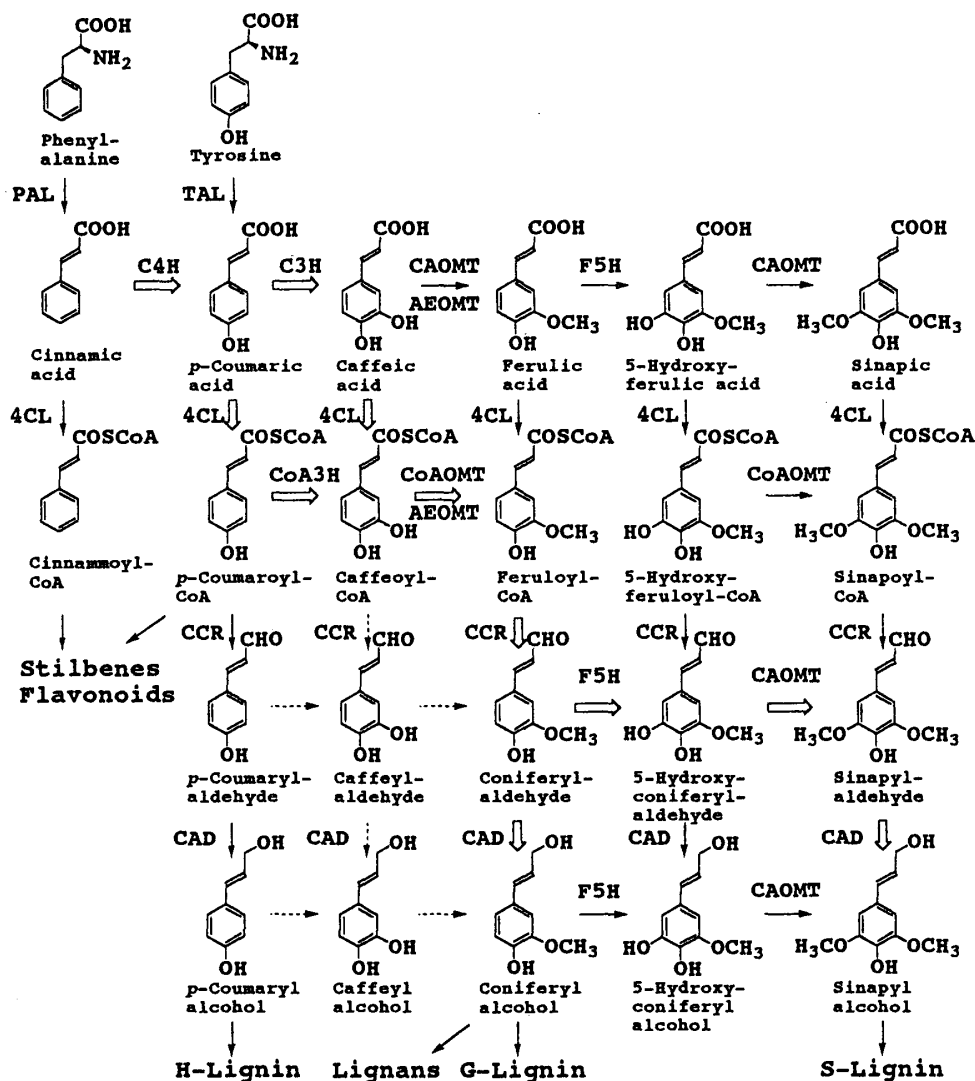


図1 ケイヒ酸経路

進んでいるシナピルアルコールに至るには、側鎖の還元（3段階）とベンゼン環の修飾（5段階）を経なければならない（図1）。

これらのケイヒ酸以後の段階は、1950～1960年代に、Neish, Brown, Higuchi らにより、植物材料として主としてコムギを用いた放射性同位元素トレーサー実験をもとに、その概略が明らかにされた。その詳細は、多くの総説や著書に詳しく述べられている^{1,2)}。

2.2 ケイヒ酸経路の酵素とその遺伝子クローニング

ケイヒ酸経路の初発段階は、Koucol と Conn³⁾ および Neish⁴⁾ により相次いで1961年に報告されたフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) またはチロシンアンモニアリアーゼ (TAL) によって触媒される、フェニルアラニンまたはチロシンのケイヒ酸または4-ヒドロキシケイヒ酸 (=p-ヒドロキシケイヒ酸, 4-クマール酸, p-クマール酸) への変換である。この、PAL と TAL が別の酵素か否かについては、従来から問題になっていたが、最近、PAL の組換え酵素の反応を解析することにより、一応決着をみた。すなわち、パセリ (*Petroselinum crispum*) の PAL cDNA を大腸菌で発現させて得られ

た組換え酵素の K_m は、フェニルアラニンに対して $15\sim 24.5\ \mu\text{M}$ であり、チロシンに対して 3桁大きい $2.6\sim 7.8\ \text{mM}$ であった⁵⁾。一方、トウモロコシ (*Zea mays* cv. Corso) の PAL cDNA を同様に大腸菌で発現させて得られた組換え酵素の K_m は、フェニルアラニンおよびチロシンに対してそれぞれ $270\ \mu\text{M}$ と $19\ \mu\text{M}$ であり、トウモロコシの酵素が、PAL 活性と TAL 活性を併せ持つことが示された⁶⁾。

ケイヒ酸以後のケイヒ酸経路の各反応を触媒する酵素は、1) ベンゼン環の修飾：ケイヒ酸 4-ヒドロキシラーゼ (C4H)、4-クマール酸 3-ヒドロキシラーゼ (C3H)、4-クマロイル CoA 3-ヒドロキシラーゼ (CCoA3H)、カフェー酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ (CAOMT)、カフェオイル CoA *O*-メチルトランスフェラーゼ (CoAOMT)、フェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ (F5H)、2) 側鎖の還元：4-ヒドロキシケイヒ酸：CoA リガーゼ (4CL) (対応する CoA エステルの生成)、シンナモイル-CoA レダクターゼ (CCR) (ケイヒアルデヒド類の生成)、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) (ケイヒアルコール類の生成) である。これらの多くは、主に、1970年代から1980年代初頭にかけて次々と単離精製された⁷⁾。

その後、1980年代の後半から、1990年代にかけて各酵素の遺伝子に関する報告が相次いでなされており、C3H および CCoA3H 以外は全て cDNA クローニングが報告されている。そして、1990年代の後半以降、これらの酵素に関する代謝工学的研究も数多く報告されている。

2.2.1) ベンゼン環の修飾に関わる酵素

ケイヒ酸 4-ヒドロキシラーゼ (C4H) は、 O_2 と NADPH の存在下、ケイヒ酸の 4-位を水酸化する P450 型モノオキシゲナーゼである^{8,9)}。この酵素は、キクイモ (*Helianthus tuberosus*) から、均一に精製され¹⁰⁾、cDNA も、マングビーン (*Vigna mungo*)¹¹⁾、キクイモ¹²⁾、アルファルファ (*Medicago sativa*)¹³⁾、ニチニチソウ (*Cartharanthus roseus*)¹⁴⁾、ポプラ (*Populus kitakamiensis*)¹⁵⁾ からクローニングされている。

4-クマール酸 (4-ヒドロキシケイヒ酸) あるいはその CoA エステルの 3-位の水酸化を触媒する酵素、4-クマール酸 3-ヒドロキシラーゼ (C3H) と 4-クマロイル CoA 3-ヒドロキシラーゼ (CCoA3H) に関しては不明の点が多く残されており、ケイヒ酸経路の諸酵素のうち、cDNA クローニングが報告されていない最後の酵素である。スピナッチビート (*Beta vulgaris*) から精製されたフェノールオキシダーゼが、4-クマール酸をカフェー酸へ酸化するという報告¹⁶⁾や、マングビーン (*V. mungo*) を用いた研究により、特異的な C3H が存在するという報告¹⁷⁾、ジャガイモの酵素による 4-クマール酸からのカフェー酸の生成の報告¹⁸⁾もあるが、4-クマロイル CoA¹⁹⁻²¹⁾ あるいは、その他の 4-クマール酸エステル²²⁻²⁴⁾ の 3-位の水酸化も報告されている。4-クマロイル CoA の 3-位の水酸化が主要経路であっても、後述の、より下流段階 (特に OMT によるメチル化) に関する最近の研究結果^{25,26)} とは特に矛盾しない。

ケイヒ酸経路の *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) は、プロピル側鎖の状態に応じて 3 種類に分けられる。すなわち、主にヒドロキシケイヒ酸類のメチル化に与るいわゆるカフェー酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ (CAOMT)、ヒドロキシシンナモイル CoA エステル類のメチル化に与るいわゆるカフェオイル CoA *O*-メチルトランスフェラーゼ (CoAOMT) および両者にほぼ同等に働くヒドロキシケイヒ酸・ヒドロキシシンナモイル CoA *O*-メチルトランスフェラーゼ (AEOMT) である。最近、Chiang らは、双子葉類の CAOMT の実体は、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒド OMT であり、AldOMT と改称すること提案している^{25,26)}。これらの OMT の酵素の性質や機能に関しては、過去数年間に研究が大きく進展しており、次項にて詳述する。

フェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ (F5H) 活性は、1984年に Grand によって初めて報告された²⁷⁾。ポプラ (*Populus × euramericana* cv. I 214) から得られたこの酵素は、活性の一酸化炭素阻害と光回復が見られることから、P-450 型モノオキシゲナーゼであり、NADPH 要求性である。Chapple らは、1996年にシナポイルマレートとシリングリゲニンの産生能を欠くシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の変

異株を指標とし、T-DNA タギング/プラスミドレスキューにより初めてシロイヌナズナから F5H cDNA をクローニングした²⁸⁾。ついで、Osakabe ら²⁵⁾も、スウィートガム (*Liquidambar styraciflua*) から、F5H cDNA (LsM88) をクローニングしたが、LsM88 を酵母で発現させて得た組換え酵素の性質を詳細に検討することにより、彼等は、F5H の実体がコニフェリルアルデヒド 5-ヒドロキシラーゼであることを報告し、CAld5H に改称することを提案した。なお、CAld5H の機能は、OMT の役割との関連で後述する。

2.2.2) プロピル側鎖末端の還元に関わる酵素

プロピル側鎖末端の還元に関わる酵素活性は、1972年に初めて Mansell, Zenk ら²⁹⁾によって報告された。彼らは、セイヨウシロヤナギ (*Salix alba*) の無細胞抽出液による、フェルラ酸のコニフェリルアルコールへの還元を報告した。この段階では中間体に関する実験的確認は得られておらず、フェルロイル CoA とコニフェリルアルデヒドが想定されるに留まっていたが、4-ヒドロキシケイヒ酸 : CoA リガーゼ (4CL), シンナモイル-CoA レダクターゼ (CCR), シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD), の活性が、実際上一挙に検出されていたことになる。そして、その後直ちに、4CL, CCR および CAD の個々の活性もレンギョウ (*Forsythia* sp.) から検出されている。すなわち、彼らは、フェルラ酸からのフェルロイル CoA の生成、フェルロイル CoA からのコニフェリルアルデヒドの生成、コニフェリルアルデヒドのコニフェリルアルコールへの還元³⁰⁾並びに、4-クマール酸、4-クマロイル CoA および 4-クマリルアルデヒドからの、4-クマリルアルコールの生成を確認した³¹⁾。また、同時に、Ebel と Grisebach も、ダイズ (*Glycine max*) の粗酵素によるフェルラ酸、4-クマール酸および 4-クマロイル CoA の、対応するケイヒアルコールへの還元を報告している³²⁾。

4CL は、モノリゲノール生合成の他、フラボノイドやスチルベンの生合成にも関わっており、酵素の性質や遺伝子に関して多くの研究が報告されている⁷⁾。4CL に関して重要なのは、その基質特異性であり、特に、シナップ酸を基質とすることのできる 4CL の報告が双子葉植物についても少ないことである。例えば、酵素実験ではないが、古く40年以上も前に、Brown と Neish³³⁾ が、トネリコバノカエデ (*Acer negund* var. *interius*) に [¹⁴C] シナップ酸を投与した場合、リグニンへの取込みが殆ど認められなかったと報告している。また、Gross³⁴⁾ は、レンギョウ (*Forsythia suspensa* var. *fortunei*) の 4CL につき、4-クマール酸、フェルラ酸、シナップ酸に対する活性を比較し、前二者は基質となるのに対し、シナップ酸には不活性であることを報告した。さらに、Kutsuki ら³⁵⁾は、供試した13種の被子植物および裸子植物の 4CL の殆どは、フェルラ酸を基質とし、シナップ酸には働かないが、ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia*), マルバデイゴ (アメリカデイゴ) (*Erythrina crista-galli*) およびマダケ (*Phyllostachys bambusoides*) の酵素は、フェルラ酸 (FA), シナップ酸 (SA) 共に基質とすることを報告している。

ただ、マルバデイゴは広葉樹 (マメ科) でありながら、そのリグニンは、主としてグアヤシル型である³⁶⁾。よって、マルバデイゴにおけるリグニン生合成では、シナップ酸に対する 4CL 活性が認められなくても、少なくとも見かけ上不合理には見えないのに、シナップ酸に対する 4CL 活性が特に認められていることになる。また、これと関連して、マルバデイゴの CAOMT は、5-ヒドロキシフェルラ酸のシナップ酸 (SA) へのメチル化活性が、カフェー酸のフェルラ酸 (FA) へのメチル化活性の3.3倍 (これを、FA/SA=1/3.3 と表す) であった³⁶⁾。そして、Kutsuki, Higuchi は、マルバデイゴの 4CL と OMT が、シリリング核の生成に適した基質特異性を示すにも関わらず、リグニンが主としてグアヤシル型であるのは、F5H の活性が欠損していることによると推定している³⁷⁾。

一方、Grand ら³⁸⁾は、3つの 4CL アイソフォームをポプラ (*Populus × euramericana*) から精製し、その基質特異性を比較した。この内、2つのアイソフォームは、シナップ酸を基質とせず、木部と柔細胞で発現しているのに対し、残りの1つは、シナップ酸を基質とし、シリリングリグニンに富む師部厚壁細胞や木部で主に発現していた。ただ、Kutsuki らは、ポプラ (*P. × euramericana*) 4CL 粗酵素につい

て、シナップ酸に対する活性を検出しておらず³⁵⁾、また、Meng と Campbell も ポプラ (*Populus tremuloides*) の 4CL 粗酵素について、基質特異性を測定したが、シナップ酸に対する活性は検出されていない³⁹⁾。なお、木化の進行と共に、メトキシ基含量が増大することが、一般に知られている^{1,40~43)}ので、シリングル核に特異的な 4CL 遺伝子が存在しても、適切な時期の材料を選ばなければ、その酵素活性を検出することが出来ないと言う可能性も考えておかねばならないであろう。

種々のケイヒ酸類に対する 4CL の比活性を比較すると、一般に、4-ヒドロキシケイヒ酸、フェルラ酸およびカフェー酸に対する比活性が高い³⁵⁾が、リグニン生合成に関与する 4CL アイソザイムとその生理的な基質は、まだ最終的な特定に至っておらず、今後のさらなる解明が待たれる。なお、後述のように、Chiang らは、双子葉植物のリグニン生合成に対して、4-クマール酸またはカフェー酸の段階で CoA エステル化を受ける経路を提案している^{25,26)}。いずれにしても、4CL cDNA のクローニングも既にかなり報告されている^{7,44)}ので、今後はダウンレギュレーションなどを通じて、それぞれの 4CL 遺伝子の機能をより詳細に検討し、リグニン生合成に特異的な 4CL を確証することが必要であろう。なお、Douglas らは、4CL をダウンレギュレートした形質転換シロイヌナズナでは、顕著にシリングル核とグアヤシル核の比 (S/G 比) が上昇することから、シナップ酸からのシナピルアルデヒドへ至る 4CL 非依存性経路の存在の可能性を指摘している⁴⁵⁾。また、彼らは、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi SRI) 粗抽出物中に、4CL によるケイヒ酸類の CoA エステル化のうち、ケイヒ酸の反応のみを特異的に阻害する熱不安定な高分子が存在することを報告しているのは、代謝制御の観点から興味深い⁴⁶⁾。

CCR については、比較的研究例が少ないが、1972~1973年に初めて酵素活性が報告された^{29~32)}後、ダイズ (*Glycine max* var. *mandarin*) の CCR が精製された。そして、フェルロイル CoA が最もよい基質であり (K_m が最小かつ速度最大)、5-ヒドロキシフェルロイル CoA、シナポイル CoA、4-クマロイル CoA、カフェオイル CoA の順でこれに続くと報告された⁴⁷⁾。同様に、Sarni ら⁴⁸⁾は、ポプラ (*Populus euramericana*) の精製 CCR では、フェルロイル CoA、シナポイル CoA、4-クマロイル CoA の順に V_{max}/K_m 値が下がると報告している。また、彼等は、ポプラの本部と師部厚壁細胞では、S/G 比が異なるのに、それぞれから抽出された CCR の基質特異性に変わりがないことから、この酵素は、リグニンのモノマー組成の決定には関与していないであろうと考えている。さらに、セイヨウカジカエデ (*Acer pseudoplatanus*) の CCR の比活性も、フェルロイル CoA に対して高く、広葉樹であるにもかかわらず、シナポイル CoA の比活性は、フェルロイル CoA に対する 8%であると報告されている³⁴⁾。これに対して、針葉樹であるスプルース (*Picea abies*) の精製 CCR でも、フェルロイル CoA がよい基質であるが、この CCR は、シナポイル CoA や 4-クマロイル CoA にはほとんど働かなかった⁴⁹⁾。なお、CCR cDNA は、ユーカリ (*Eucalyptus gunnii*) からクローニングされている⁵⁰⁾。

CAD 活性は、上述のように、1972~1973年に初めて報告された^{29~32)}が、その後直ちに、レンギョウ (*Forsythia suspensa*)⁵¹⁾とダイズ (*Glycine max* var. *mandarin*)⁵²⁾から CAD が精製された。レンギョウ CAD の基質特異性は比較的広く、コニフェリルアルデヒド、シナピルアルデヒド、4-クマールアルデヒドに加えそれらのメチルエーテルもよい基質となった。一方、ダイズからは、2種のアイソフォームが精製されたが、そのうちの1つは、コニフェリルアルデヒドに特異的で、シナピルアルデヒドや4-クマールアルデヒドは基質とならないのに対し、他方は、コニフェリルアルデヒド、シナピルアルデヒド、4-クマールアルデヒドのいずれにも作用することが示された。さらに、Kutsuki ら⁵³⁾は、17種の針葉樹、広葉樹およびイネ科植物の CAD について、そのコニフェリルアルデヒドとシナピルアルデヒドに対する比活性を比較した。その結果、針葉樹の CAD は、シナピルアルデヒドに対する比活性が一般に低く、広葉樹の CAD は、シナピルアルデヒドに対する比活性が高いことが示された。よって、彼等は、OMT に加え、CAD アイソザイムの基質特異性が、針葉樹および広葉樹のリグニンのモノマー組成の

決定因子の1つになっていると結論している。

CAD はその後、ウド (*Aralia cordata*)⁵⁴⁾ を始めとして、多くの植物から精製されている⁵⁵⁾。また、CAD cDNA のクローニングは、Knight ら [タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)]⁵⁶⁾、O'Malley ら [ロブローパイナ (*Pinus taeda*)]⁵⁷⁾、Hibino ら [ウド (*A. cordata*)]⁵⁸⁾ の報告を始めとして、1992年以降立て続けに数多く報告されている⁴⁴⁾。

2.2.3) O-メチルトランスフェラーゼ (OMT) の機能

2.2.3.1) 初期の OMT 研究

針葉樹リグニン、主にコニフェリルアルコール、広葉樹リグニン、主にコニフェリルアルコールとシナビルアルコール、およびイネ科植物リグニンでは、主にコニフェリルアルコール、シナビルアルコール、4-ヒドロキシケイヒアルコールが重合して出来ている。ケイヒ酸経路の研究は、このリグニンの芳香核置換様式の多様性の決定因子の検討を常に念頭において、進められてきたが、その嚆矢となるものは、針葉樹リグニン [グアヤシル (G) リグニン] と広葉樹リグニン [グアヤシル (G)・シリリングル (S) リグニン] の構造を、O-メチルトランスフェラーゼ (OMT) アイソザイムの基質特異性の違いで説明した、1970～1980年代の Shimada, Kuroda, Higuchi らの系統的な研究である。

カフェー酸類に対する OMT (CAOMT) 活性は、カフェー酸のフェルラ酸へのメチル化活性が、まず、1963～1964年に、Finkle らによって、リンゴ形成層⁵⁹⁾ およびパンパスグラス (*Cortaderia selloana*)⁶⁰⁾ から検出された。更に、1965年に、Hess は、ペチュニア (*Petunia hybrida*) などの粗酵素が、CA からの FA の生成に加えて、5-ヒドロキシフェルラ酸 (5HFA) のシナップ酸 (SA) へのメチル化を触媒することを見出した⁶¹⁾。

次いで、Shimada, Kuroda, Higuchi らは、一連の研究により、カフェー酸のメチル化 [フェルラ酸 (FA) の生成]/5-ヒドロキシフェルラ酸のメチル化 [シナップ酸 (SA) の生成] の比 (FA/SA 比) を、針葉樹 [クロマツ (*Pinus thunbergii*), イチョウ (*Ginkgo biloba*)], 広葉樹 [ポプラ (*Populus nigra*), ヤナギ (*Salix caprea*), ヤマグワ (*Morus bombycis*)], イネ科植物 [タケ (*Phyllostachys pubescens*, *Phyllostachys reticulata*)] で比較した⁶²⁻⁶⁷⁾。その結果、大雑把には、針葉樹の OMT は、FA/SA \approx 1/0.05, 広葉樹の OMT は、FA/SA \approx 1/2～1/3, イネ科植物の OMT は、FA/SA \approx 1/1 であることから、針葉樹リグニンと広葉樹 (あるいはイネ科植物) のリグニンのモノマー構造の違いが、OMT の基質特異性、すなわちカフェー酸と5-ヒドロキシフェルラ酸に対するメチル化能の違い、で説明された。さらに、Kuroda は、合計59種の裸子、双子葉、単子葉植物の FA/SA 比を取りまとめ報告している。その結果、興味ある例外も散見されるが、上述の植物分類上の FA/SA 比の違いは、概略としては、多くの植物種にあてはまることが示された⁶⁸⁾。

次いで、彼らは、タケ (*Bambusa* sp.)⁶⁹⁾、クロマツ (*P. thunbergii*) 芽生え⁷⁰⁾、ポプラ (*Populus eur-american*)⁷¹⁾ の OMT を精製し、その性質を調べた。その結果、いずれの OMT も精製中に、その FA/SA 比はそれほど変化しなかった。また、クロマツとポプラの精製 OMT は、いずれも Mg^{2+} を活性発現に要求しないことから、これらは、現在 CAOMT あるいは AldOMT と呼ばれている酵素に相当すると考えられる。なお、タケ (*P. pubescens* and/or *P. reticulata*) の粗 OMT も活性発現に Mg^{2+} を要求しないことが報告されている⁶²⁾。

一方、Poulton らは、スピナッチビート (*Beta vulgaris*)⁷²⁾ とダイズ (*Glycine max* var. *mandarin*)^{73,74)} から、CAOMT を精製し、その性質を検討している。ダイズの酵素の FA/SA 比が、約 1/2 であることや Mg^{2+} を要求しないことなど、上述の Shimada, Kuroda, Higuchi らの結果と概ね一致しているが、その他、フラボノイド OMT との性質の比較や、カフェオイル CoA からのフェルロイル CoA の生成は認められなかったこと、また、ケルセチンとルテオリンが基質とならず阻害剤となることなどを報告している。

その後、ポプラ (*Populus tremuloides*) の CAOMT⁷⁵⁾ を皮切りに、多くの植物双子葉類およびイネ科植物から、CAOMT cDNA のクローニングが報告されている^{44, 76)}。

なお、これらの、ケイヒ酸経路の OMT に関する比較的初期の研究が行われた時代には、後述の CoAOMT の存在は知られておらず、また、フィーディング実験の結果、フェルラ酸→5-ヒドロキシフェルラ酸→シナップ酸の変換が確立されていたこと¹⁾、さらに、基質調製に手間がかかることなどから、CAOMT の基質として、ケイヒ酸側鎖末端が、CoA エステル、CHO、あるいは CH₂OH のものは、ほとんど供試されていなかった。ただし、上述の Poulton らによるカフェオイル CoA を用いた実験⁷⁴⁾や、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドのメチル化によるシナピルアルデヒドの生成例の報告はある^{77, 78)}。特に後者の実験は、上述のように、シナップ酸に対する 4CL の活性が一般にきわめて低いことから、シナップ酸からシナポイル CoA へ至る経路をさけて、5-ヒドロキシフェルラ酸で側鎖の還元系に入るバイパスが想定されたことにより、行われたものである^{35, 68, 79)}。

2.2.3.2) CoAOMT の発見

1980年代には、植物の生体防御と関連してフェルラ酸の生成に興味をもたれていた。ところが、パセリ (*Petroselinum hortense*) 培養細胞の OMT は、カフェー酸に対するアフィニティーが低いこと等が報告され、この系でのフェルラ酸の生成におけるカフェー酸のメチル化に疑いがもたれた。これらが下地となって、1988～1989年に、カフェー酸よりカフェオイル CoA に特異性の高い OMT (CoAOMT) が、パセリ (*P. hortense*) 培養細胞から見い出された^{80, 81)}。また、この報告とは別個に、4-クマール酸の3位の水酸化が、遊離の酸でなく、シキミ酸などとのエステルの場合に効率的に進行することから、メチル化もカフェー酸よりカフェオイル CoA の場合効率的に進行するのではないかの予測のもとに、ニンジン (*Daucus carota*) 培養細胞からも、CoAOMT 活性が検出された⁸²⁾。そして、これらの CoAOMT は共にエリシター処理によって、活性が増大することから、CoAOMT は生体防御に関わっているとされた^{81, 82)}。

その後、パセリ (*Petroselinum crispum*) の CoAOMT の精製⁸³⁾と、精製酵素の性質が報告された⁸⁴⁾。そして、直ちにパセリ (*P. hortense*) CoAOMT の全長 cDNA がクローニングされた⁸⁵⁾。このクローンをを用いたノーザン分析により、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*)、カーネーション (*Dianthus caryophyllus*)、ニンジン (*Daucus carota* ssp. *sativus*) にも、CoAOMT が存在することが示唆された。また、カーネーションなどの培養細胞をエリシター処理した後の Poly(A)⁺ RNA について、スロットブロット分析を行ったところ、CoAOMT mRNA 量が、エリシター処理によって増大することが示され、CoAOMT は、抵抗性発現に関わっているとする従来の結論が補強された。

2.2.3.3) CoAOMT の木化への関与

上述の様に、CoAOMT は植物の生体防御に関わっていることが示されたが、木化への関与は否定されてはいなかった。1990年代の中ごろになって、この点が Ye らによって集中的に検討された。

彼等はまず、ヒャクニチソウ (*Zinnia elegans* var. *peter pan*) の葉肉細胞から誘導された道管要素から、CoAOMT cDNA クローンを単離し、CoAOMT mRNA の発現を検討した。その結果、培養葉肉細胞には、CAOMT、CoAOMT 共に活性が認められたが、木化しつつある分化中の道管要素で mRNA の発現量が著しく上昇するのは、CoAOMT のみであることが示された。よって、彼等はヒャクニチソウの *in vitro* で分化中の道管要素の木化では、CoAOMT によって触媒されるメチル化経路が主要であると結論した。また、CoAOMT 遺伝子の発現は、ヒャクニチソウの木部繊維と師部繊維においても見られることが、ティッシュプリントハイブリダイゼーションによって示された。要するに、彼等の研究によって CoAOMT の木化への関与が示されたが、加えて彼等は、CoAOMT と CAOMT が、ヒャクニチソウの異なるタイプの細胞で、異なる時期に発現する可能性に言及している。すなわち、CoAOMT は、道管要素と木繊維の木化に共に関与するが、CAOMT は、主に木部繊維と師部繊維の木化に関与

し、道管要素の木化には関与しないと言う可能性である⁸⁶⁾。

Ye らは、実際上記の可能性、すなわち、CoAOMT と CAOMT の発現の違いについて検討した。その結果、ヒヤクニチソウの若い節間では、木部の道管のみが木化しつつあるが、この道管では、CAOMT mRNA も CAOMT タンパクも共にはっきりとは検出されなかった。これに対し、CoAOMT mRNA は、主に分化中の木部に検出された。一方、より古い節間では、木部繊維、師部繊維、木部の道管の全てで木化が進行していたが、CAOMT mRNA と CoAOMT mRNA のシグナルは共に、師部繊維と分化中の木部で強く検出された。結局、CoAOMT は、全ての細胞の木化に関わっているのに対し、CAOMT は、道管要素よりも主に繊維の木化に関与していると結論された⁸⁷⁾。さらに、Ye は、ヒヤクニチソウ以外の植物 [タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi), レンギョウ (*Forsythia suspensa* cv. Fortunei), アルファルファ (*Medicago sativa* cv. CUF101), ダイズ (*Glycine max* cv. William), トマト (*Lycopersicon esculentum* cv. UC82B)] についても、ウエスタンブロット法により、CoAOMT タンパクが全ての木化組織 (道管要素, 木部繊維, 師部繊維) で検出されることを見出し、CoAOMT は、双子葉類の木化に広く関わっていると推定している⁸⁸⁾。

一方、針葉樹の CoAOMT は、Li らによって最近報告された。彼等は、ロブローリーパイン (テダマツ) (*Pinus taeda*) から、CoAOMT cDNA をクローニングすると共に、この CoAOMT のプロモーターに GUS 遺伝子をつないだものをタバコに導入することにより、GUS 遺伝子が二次木部に特異的に発現することを確認している⁸⁹⁾。よって、下記の AEOMT と共に、ロブローリーパインの木化に CoAOMT が関与しているとしている。

すなわち、AEOMT の cDNA は、上記の CoAOMT cDNA⁸⁹⁾ に先立ち、Li らによってロブローリーパイン (*P. taeda*) からクローニングされた⁹⁰⁾。ここで彼らは、新規 OMT cDNA をクローニングし、酵母で発現させて得た組換え酵素の基質特異性を調べた。その結果、ケイヒ酸/5-ヒドロキシフェルラ酸/カフェオイル CoA/5-ヒドロキシフェルロイル CoA に対する比活性の比は 31/24/27/21 であり、いずれの基質にも同程度の活性を示した。この基質特異性は、既知の CAOMT, CoAOMT のいずれとも異なり、また、cDNA の塩基配列をもとにしたアミノ酸配列のレベルでも、CAOMT, CoAOMT のいずれとも similarity が低いことから、彼等は、この酵素が新規の S-アデノシルメチオニン依存性 OMT であるとして、ヒドロキシケイヒ酸/ヒドロキシシナモイル CoA OMT (AEOMT) と命名している。そして、ロブローリーパインの木部から得た酵素標品の活性が、AEOMT 抗体で阻害されることなどから、AEOMT が木化に関与していると結論した⁹⁰⁾。

なお、Meng と Campbell は、ポプラ (*Populus tremuloides*) の CAOMT と CoAOMT の基質特異性を比較した⁹¹⁾。すなわち、カフェー酸/5-ヒドロキシフェルラ酸/カフェオイル CoA/5-ヒドロキシフェルロイル CoA に対する比活性の比は、大腸菌で発現させた組換え CAOMT および CoAOMT で、それぞれ 480/1,077/140/265 および 0.9/2.3/20.6/8.3 であると報告している⁹¹⁾。また、Inoue らは、アルファルファ (*Medicago sativa* cv. Apollo) の CAOMT と CoAOMT の場合、カフェー酸/5-ヒドロキシフェルラ酸/カフェオイル CoA/5-ヒドロキシフェルロイル CoA に対する比活性の比は、大腸菌で発現させた組換え CAOMT および CoAOMT で、それぞれ 1/2.2/0.4/1.1 および 1/15.5/131/75 であると報告している⁴⁰⁾。また、大腸菌で発現させた、ヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera* cv. Pinot Noir) の CoAOMT⁹²⁾、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) の CoAOMT⁹³⁾ およびパセリ (*Petroselinum hortense*) の CoAOMT⁹⁴⁾ は、遊離のカフェー酸や 5-ヒドロキシフェルラ酸を基質としないと報告されている。針葉樹であるロブローリーパイン (*P. taeda*) の CoAOMT (大腸菌発現組換え酵素) では、カフェー酸/5-ヒドロキシフェルラ酸/カフェオイル CoA/5-ヒドロキシフェルロイル CoA に対する比活性の比が、5/8/100/32 と報告されている⁸⁹⁾。さらに、ヒヤクニチソウ (*Z. elegans* var. *peter pan*) の CAOMT (大腸菌発現組換え酵素) では、カフェー酸/5-ヒドロキシフェルラ酸/カフェオイル CoA に

対する比活性の比が、54/199/1 と報告された⁸⁷⁾。これらの報告は、いずれも、CAOMT と CoAOMT が、ヒドロキシケイヒ酸類とその CoA エステルに、それぞれ特異性が高いことを示しているが、タバコ (*N. tabacum* cv. Samsun NN) の class I CAOMT が、カフェー酸よりカフェオイル CoA により高い活性を示すという報告もある (V_{\max}/K_m 値で比較したカフェー酸/カフェオイル CoA に対する活性比が、約 1.5/1)⁹⁵⁾。

2.2.3.4) OMT のダウンレギュレーション

Dwivedi ら⁹⁶⁾は、ポプラ (*Populus tremuloides*) の二機能 (CA と 5-HFA の両方のメチル化を触媒するという意味での) CAOMT の cDNA を CMV35S プロモーターにアンチセンス方向に繋ぎ、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Havana) に導入した。その結果、リグニン量はそれほど減らないのに対し、S/G 比がかなり減少し、シリリングリグニンが特異的に減少すると報告した。そして、彼等は、この二機能 CAOMT 以外に木化に関わる OMT があることを推定したが、実際、上述の様にほぼ同時に、Ye らは、CoAOMT の木化への関与を報告している⁸⁶⁾。

一方、Ni と Dixon らは、アルファルファ (*Medicago sativa* cv. Apollo) の CAOMT cDNA を CMV35S プロモーターにアンチセンス方向に繋ぎ、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) に導入した。彼等は、OMT 活性の減少と、チオグリコール酸リグニン量の減少を認めているが、個々の形質転換体については、OMT 活性とリグニン量に相関がなかった⁹⁷⁾。そこで彼等は、後にこの形質転換タバコの内、最も OMT 活性が低かった個体について再分析し、OMT 活性、クラーソンリグニン量がそれぞれ、コントロールの70%と85%まで減少し、S/G 比が若干上昇すると報告している⁹⁸⁾。

次いで、Doorselaere らは、ポプラ (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) の CAOMT cDNA を CMV35S プロモーターにアンチセンス方向に繋ぎ、ポプラ (*Populus tremula* × *Populus alba*) に導入した。その結果、リグニン量 (クラーソン法とアセチルブロマイド法による) には大きな変化は見られないが、CAOMT 活性が95%阻害されると共に、S/G 比がコントロール (wild-type) の 1/6 に低下した形質転換体を得た。さらに、通常は見られない、5-ヒドロキシグアヤシル核を検出している⁹⁹⁾。

同様に、Tsai らも、ポプラ (*P. tremuloides*) の CAOMT をホモローガスセンスサプレッションによりダウンレギュレートし、リグニン量には変化がみられないが、S/G 比が大きく低下すると共に 5-ヒドロキシグアヤシル核を多量に含む形質転換体を得ている¹⁰⁰⁾。

一方、Atanassova らは、全長を含め様々な長さのタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) の class I OMT (CAOMT) cDNA をアンチセンスおよびセンス方向で、タバコ (*N. abacum* cv. Samsun NN) へ導入し、得られた形質転換体のリグニン量、S/G 比、OMT 活性などを極めて詳細に検討した。その結果、OMT 活性が、80~90%減少してやっとリグニン組成に影響がでてくること、OMT 活性が減少しても、Klason リグニン量には変化がないこと、OMT 活性の減少の程度が高いほど S/G 比が低下し、同時に 5-ヒドロキシグアヤシル核が増加すること、全長でない cDNA を導入すると、幼植物では OMT 活性の減少が見られても、成長に伴い OMT 活性が回復することなどを報告した¹⁰¹⁾。そして、彼等は、class I OMT (CAOMT) は、シリリングリグニンの生合成に関与し、CoAOMT は、グアヤシル核の生成に関与している可能性を指摘し、CoAOMT のダウンレギュレーション実験の重要性について言及している¹⁰¹⁾。

その後、CoAOMT について、従来より検討を続けていた Ye らは、タバコ (*N. tabacum* cv. Xanthi) の CoAOMT および CAOMT をそれぞれ別個に、あるいは、両者を共に、タバコ (*N. tabacum* cv. Xanthi) にアンチセンス方向で導入し、形質転換体のリグニン量や OMT 活性などを分析した。その結果、興味あることに、CoAOMT を単独でダウンレギュレートし、CoAOMT 活性の減少が見られた形質転換体では、リグニン量が減少し、グアヤシルおよびシリリング核が共に減少していた。また、CAOMT を単独でダウンレギュレートすることにより、CAOMT 活性の減少した形質転換体では、リ

ゲニン量はそれ程減少せず、シリリング核量が大きく減少した。一方、CoAOMT および CAOMT を共にダウンレギュレートした形質転換体では、CoAOMT のみをダウンレギュレートした場合よりも、さらに大きくリゲニン量が低下した¹⁰²⁾。この結果は、CoAOMT の木化への関与を決定的に裏付けると共に、OMT のダウンレギュレーションに関する、上述した他の報告とも、Dixon ら^{97,98)} のデータを除いてよく一致する。ただ、in vitro で、5-ヒドロキシフェルロイル CoA のメチル化を CoAOMT が触媒することができることから、Ye ら¹⁰²⁾ は、CAOMT のダウンレギュレーションのみが、大幅なシリリングリゲニンの減少につながったことに関しては、十分な説明をすることが出来ず、フェルロイル CoA の水酸化酵素が存在しないからと考えると、一応説明がつくとしている。なお、ごく最近 Ye ら¹⁰³⁾ は、ポプラ (*P. tremula* × *P. alba*) の CoAOMT についても、上述のタバコの場合¹⁰²⁾ と同様の結果を得ている。すなわち、この CoAOMT をアンチセンス法でダウンレギュレートすることにより、リゲニン量が大幅に減少すると共に、グアヤシルおよびシリリング核両方の減少をともなった形質転換ポプラを得た¹⁰³⁾。

2.2.3.5) ケイヒアルデヒド経路

ともあれ、以上の OMT のダウンレギュレーション実験の結果より、双子葉植物のリゲニン生合成における、CAOMT と CoAOMT の役割について、興味あるそしてかなり確からしい推定が成り立つ様になった。すなわち、CAOMT は、グアヤシル核からのシリリング核の生成に関与し、CoAOMT は、グアヤシル核の生成に関与している可能性である。しかし、メボリックグリッド上の主要代謝経路の詳細、特にメタボリックグリッド上のどの段階に、これら 2 種の OMT が配置されているのかについては、なお不明で、単なる推定の域を越えておらず、また、類似のダウンレギュレーション実験をくり返しても、この点は解決できそうになかった。

この問題は、ごく最近の Chiang ら^{25,26)} の報告により、解決を見た。すなわち、彼らは²⁵⁾、スウィートガム (*Liquidambar styraciflua*) から、P450 モノオキシゲナーゼ (LsM88) と CAOMT の cDNA をクローニングした。そして、LsM88 cDNA をシロイヌナズナの NADPH-Cytochrome P450 Reductase (CPR) と、酵母で共発現させることにより、モノオキシゲナーゼ活性を得た。LsM88 は、フェルラ酸の水酸化を触媒するのみならず、コニフェリルアルデヒドの水酸化による 5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドの生成も触媒した。そればかりか、コニフェリルアルデヒドに対する k_{cat}/K_m 値はフェルラ酸に対するその約140倍であった。特に重要なことに、コニフェリルアルデヒドが、フェルラ酸の水酸化の非競争阻害剤 ($K_i=0.59 \mu\text{M}$) となることも見い出された。同様の結果は、スウィートガム木部から調製したミクロソーム画分を用いても得られ、また、フェルロイル CoA やコニフェリルアルコールの水酸化活性は認められなかった。これらのことから、彼等は、LsM88 をコニフェリルアルデヒド 5-ヒドロキシラーゼ (CAld5H) と命名した。さらに、フェルラ酸とコニフェリルアルデヒドを基質として共存させたとき、コニフェリルアルデヒドの水酸化のみが進行することは、スウィートガム以外にも、ポプラ (*Populus tremuloides*) を始めとする 9 樹種の酵素標品について確認された²⁶⁾。

一方、大腸菌で発現させたスウィートガム組換え CAOMT およびスウィートガム木部から得た CAOMT は、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドと 5-ヒドロキシフェルラ酸のメチル化を、ほぼ同じ比活性で触媒し、それぞれシナビルアルデヒドとシナップ酸を生成させることが出来た。よって、CAld5H の基質特異性とあわせ、ケイヒアルデヒドの酸化段階でシリリング核が生成しうることが示された²⁵⁾。彼等は、さらに、ポプラ (*P. tremuloides*) の大腸菌組換え CAOMT を用い、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドのメチル化について詳細に検討した²⁶⁾。すなわち、ポプラ組換え CAOMT の 5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドに対する V_{max}/K_m 値は、5-ヒドロキシフェルラ酸とカフェー酸に対する値のそれぞれ、5 および 31 倍であった。さらに、特に重要なことに、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒド、5-ヒドロキシフェルラ酸およびカフェー酸の等モル混合物を基質とした場合、5-ヒドロキ

シコニフェリルアルデヒドのシナピルアルデヒドへのメチル化のみが進行し、他の二基質のメチル化は阻害されていた。この5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドによる阻害は、ポプラ、スウィートガムを含む10樹種の酵素標品についても確認された。以上の結果から、Chiang らは、従来ヒドロキシケイヒ酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ (CAOMT) と呼ばれていたものの実体は、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒド OMT であり、AldOMT と略称するよう提案すると共に、ケイヒアルデヒドの段階でのシリングル核の生成をかぎとする、図1に太矢印で示した経路を双子葉植物のシリングル核の生成に関して提案している²⁶⁾。

この経路の要点は、端的には、ケイヒ酸経路のメタボリックグリッドの比較的上流段階で、CoA エステル化が起こること、および CoAOMT が3位のメチル化 (グアヤシル核の生成) に与り、CAOMT (AldOMT) は、グアヤシル核の5位のメチル化 (シリングル核の生成) に与ることである。また、この経路の制御に関して、コニフェリルアルデヒドおよび5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドが、それぞれフェルラ酸の水酸化およびカフェー酸と5-ヒドロキシフェルラ酸のメチル化を阻害することが見い出されたことは、特に興味深い。この経路の重要性は、従来から指摘されていた、双子葉植物のケイヒ酸経路のメタボリックグリッドに関する未解明の種々の問題を解決することができると共に、ダウンレギュレーション実験を始めとする最近の研究結果を包含して大筋で矛盾無く説明できる点にある。

すなわち、まず、a) リグニン生合成の組織化学に関して、広葉樹の細胞の種類とリグニン構造に関する Fukushima と Terashima らの詳細な報告^{41~43)}があり、道管のリグニンはグアヤシル (G) 核リッチで、木化も早く完了するのに対し、木繊維の場合、初期に沈着する複合中間層リグニンはG核リッチであるが、後期に沈着する二次壁リグニンは、シリングル (S) 核リッチであることが報告されている。そして、木化に供給されるリグニンモノマーは、総じて、木化初期ではG型 (コニフェリルアルコール)、後期ではS型 (シナピルアルコール) と報告されている。さらに、b) 前述のように、Ye ら⁸⁷⁾は、OMT の発現の組織および時期特異性に関して報告しており、CoAOMT は、木化中の全ての細胞で発現しているのに対し、CAOMT は道管要素よりも主に木繊維で発現していると報告した。c) また、Inoue ら⁴⁰⁾は、アルファルファ (*Medicago sativa* cv. Apollo) の節間部は、成熟に伴いメトキシル基含量が増加するが、このメトキシル基の増加と5-ヒドロキシフェルラ酸のメチル化活性の変動は相関するものの、5-ヒドロキシフェルロイル CoA のメチル化活性の変動とは相関しないことを見い出している。d) 実際、OMT のダウンレギュレーションに関する上述の Dwivedi ら⁹⁶⁾、Doorselaere ら⁹⁹⁾、Tsai ら¹⁰⁰⁾、Atanassova ら¹⁰¹⁾ および Ye ら^{102,103)}の実験結果をまとめると、双子葉植物のリグニン生合成において、CAOMT はグアヤシル核からのシリングル核の生成に関与し、CoAOMT はグアヤシル核の生成に関与していると考えられ、a~c) の結果と整合性が取れている。e) さらに、双子葉植物の4-ヒドロキシケイヒ酸 CoA リガーゼ (4CL) では、シナップ酸に対する活性がきわめて低い例が多いことが従来より知られていた^{35,79)}。f) また、ポプラ (*Populus euramericana*)⁴⁸⁾やセイヨウカジカエデ (*Acer pseudoplatanus*)³⁴⁾のCCRでは、フェルロイル CoA が最も良い基質であると考えられる。

Chiang らが報告した新経路^{25,26)}は、これら a)~f) の実験事実を包含して説明することができる。すなわち、この経路では、CoAOMT がグアヤシル核の生成に与り、CAOMT (AldOMT) は、グアヤシル核の5位のメチル化 (シリングル核の生成) に与ると共に、CoA エステルの生成が OMT が働く前の段階でおこることから、シナップ酸の CoA エステル化は回避される。

Chiang ら^{25,26)}が提案したケイヒアルデヒドの段階での水酸化とそれに引き続くメチル化によるシリングル核の生成 (この経路を、以後ケイヒアルデヒド経路と呼ぶ) は、その後、Chapple らによっても、確認された¹⁰⁴⁾。

すなわち、Chapple らは、1996年にシナポイルマレートとシリングルリグニンの産生能を欠くシロイ

ヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の変異株を指標とし、T-DNA タギング/プラスミドレスキューにより初めてシロイヌナズナから F5H cDNA をクローニングした²⁸⁾。次いで、C4H 遺伝子のプロモーターに F5H cDNA を繋ぎ、この変異株に形質転換したところ、生成したリグニンはほとんどシリンギル核からなっていたと報告した¹⁰⁵⁾。さらに、彼等は、シロイヌナズナ F5H を酵母で発現させ、組換え酵素を得た。この組換え酵素は、フェルラ酸、コニフェリルアルデヒド、コニフェリルアルコールに対する V_{max} はほぼ同じであったが、 K_m 値は大きく異なり、特にフェルラ酸の K_m 値 (1 mM) は、コニフェリルアルコール (1 μ M)、コニフェリルアルコール (3 μ M) の、それぞれ1,000倍と333倍であった。F5H とシロイヌナズナの粗 CAOMT 或は大腸菌組換え CAOMT を組み合わせてアッセイすると、生成物の同定は不十分ながら、コニフェリルアルデヒドあるいはコニフェリルアルコールからそれぞれシナピルアルデヒドとシナピルアルコールが生成したことから、フェルラ酸に対する K_m 値の高さとあわせ、彼等もケイヒアルデヒド経路を提案している。これに加え、彼等はケイヒアルコール段階の水酸化とメチル化 (ケイヒアルコール経路) も進行することを報告しているが、これは、最近、福島等が重水素標識体のフィーディング実験をもとに提唱した経路と一致する¹⁰⁶⁾。また、Maury らも、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) の CAOMT による 5-ヒドロキシコニフェリルアルコールのメチル化を報告している⁹⁵⁾。一方、Chiang らは、ケイヒアルコール段階での変換については否定的であるが²⁵⁾、ケイヒアルコール経路に関しては植物種による違いがあるかもしれない。

このように、双子葉植物のリグニン合成経路に関しては、かなり解明が進んできたが、裸子植物およびイネ科植物のリグニン合成経路はまだ未解明の部分が多く残されている。これは、1つには、針葉樹における形質転換系が双子葉植物程には確立していないことにもよると考えられる。いずれにしても、図1の太矢印の経路が、裸子植物およびイネ科植物のリグニン合成にもあてはまるかどうかは今後の課題である。また、カフェイルアルデヒドのメチル化の可能性もさらに今後検討する必要があるだろう。

これと関連して、針葉樹 [クロマツ (*Pinus thunbergii*) 芽生え] から精製された OMT の場合、FA/SA 比は 1/0.05 であった⁷⁰⁾。よって、この OMT の性質は、少なくとも基質特異性に関しては、広葉樹やイネ科植物の CAOMT とは異なっている。当時は、CoAOMT の存在は知られていなかったため、ケイヒ酸類の CoA エステルに対する基質特異性は調べられていない。しかし、 Mg^{2+} 要求性を持たないことからすると、CoAOMT ではないと考えられる。さらに、ロブローリーパイン (*Pinus taeda*) の木化には、AEOMT と CoAOMT とが共に関与しているとされている^{89,90)}が、ロブローリーパインの CoAOMT と AEOMT の FA/SA 比は、それぞれ、約 5/8 と 3/2 であり、クロマツの OMT の値 (1/0.05) とは大きく懸け離れている。従って、現時点では、上記のクロマツの OMT は、未だその cDNA がクローニングされていない CAOMT の一種である可能性がある。

上述のように、双子葉植物の CAOMT は、ゲアヤシル核ではなくてシリンギル核の生成に与り、その実体は、AldOMT であると報告されている^{25,26)}が、言うまでもなく、針葉樹リグニンは主としてゲアヤシル核からなる。よって、上記のクロマツからの OMT が、いわゆる CAOMT なら、そのリグニン生合成における役割は、双子葉植物の場合とは異なることとなり、今後の解明が待たれる。なお、Kuroda ら⁷⁰⁾は、クロマツ (*P. thunbergii*) 芽生えの OMT を精製中に、FA/SA=1/0.6 の微量画分を見出ししている。この画分の性質の詳細は、 Mg^{2+} 要求性も含めて、報告されていないが、ロブローリーパインの CoAOMT の FA/SA 比 (1/1.6)⁸⁹⁾には及ばないものの、5-ヒドロキシフェルラ酸に対する比活性が比較的高いことから、この画分が、AEOMT もしくは CoAOMT である可能性もある。

3. ケイヒ酸経路の代謝工学

ケイヒ酸経路の代謝工学を行う上での、重要な背景の1つは、ブラウンミッドリブ (BMR) 変異体の存在である。すなわち、古くから、トウモロコシ (*Zea mays*) とモロコシ (*Sorghum bicolor*) について、

維管束の周囲の木化細胞が赤褐色に変色し、リグニン含量が低く反芻動物による消化性がよい、いわゆる BMR 変異体の存在が知られていた^{107,108)}。そして、BMR の系統の中で、OMT のみの活性が低下しているトゥモロコシの系統^{107,108)}、あるいは、OMT と CAD の活性が低下しているモロコシの系統¹⁰⁹⁾が見い出された。これらの報告は、ケイヒ酸経路上の酵素を適切にダウンレギュレートすれば、成育を損なわずにリグニン量を低下させることができることを示唆しており、ケイヒ酸経路の代謝工学を加速することになった。

実際、1980年代の後半以降、続々とケイヒ酸経路の酵素の cDNA がクローニングされた後を受け、ただちに、これらの cDNA を用いたリグニン生合成の代謝工学が相次いで報告されてきた。言うまでもなく、これらの研究の目的の1つは、各々の酵素の機能の検証であるが、他方は、リグニン含量の低い（すなわちパルプ化に有利な）樹木の作出およびリグニン含量の低い（すなわち消化率の良い）飼料の作出にある。

現在までに、cDNA がクローニングされた全ての酵素（F5H 以外）について、各々をダウンレギュレートした形質転換体の作出が報告されており、OMT のダウンレギュレーションについては、上述した。これらの OMT の代謝制御の研究の結果、OMT の機能について多くの知見が得られ、シリングルリグニン生合成経路に関する理解が一新された。

一方応用面からは、4CL の制御の例が、特に興味深い。すなわち、最近 Chiang らは、ポプラ (*Populus tremuloides*) から、2 種の 4CL をクローニングし、一つ (4CL1) は、木化に、他方 (4CL2) は、おそらくフラボノイド生合成に関わることを明らかにした¹¹⁰⁾。次いで、4CL1 をアンチセンス法でダウンレギュレートした形質転換ポプラ (*P. tremuloides*) を作出した。このポプラのリグニン量は、コントロールの45%にまで減少していたが、興味あることに、セルロースの絶対量が、コントロールに対して15%増加していた。また、樹体の成育も、コントロールより良く、木繊維の形状は、コントロールと変わらないと報告されている。よって、この形質転換体は、パルプ化に適する組換え体として極めて有望であろう¹¹¹⁾。また、Kajita ら^{112,113)}および Douglas ら⁴⁵⁾も、4CL の代謝制御によるリグニン量の減少を報告している。

CAD のダウンレギュレーションも、代謝制御の観点からは興味深い。すなわち、CAD をダウンレギュレートしたタバコ (*Nicotiana tabacum* var. *samsun*¹¹⁴⁾, *Nicotiana tabacum* Xanthi nc¹¹⁵⁾) やポプラ (*Populus tremula* × *Populus alba*)¹¹⁶⁾ の場合、いずれもリグニン量は減らなかったが、リグニン中のケイヒアルデヒド構造が増え、組織が赤褐色に変色したと報告された。この変異リグニンでは、ケイヒアルデヒド類が、対応するケイヒアルコールに還元されないままリグニン中に取り込まれたことを示しており、通常の見終前駆体 (モノリグノール) でなくても、リグニンに取り込まれ得ることを示している。そして、この形質転換ポプラの変異リグニンは、アルカリにとけやすくなっており、パルプ化に際してパルプ収量はコントロールと変わらないものの、Kappa 価は低下している¹¹⁶⁾。よって、CAD の代謝制御は、パルプ化に適する樹木の分子育種の面から興味深い。なお、Higuchi らはコニフェリルアルデヒドから DHP を合成し、これが実際に赤褐色を呈することを確認している¹¹⁷⁾。

一方、ケイヒ酸経路の上流部に位置する PAL のタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) におけるダウンレギュレーションについては、Elkind ら¹¹⁸⁾、Bete ら¹¹⁹⁾、Sewalt ら¹²⁰⁾の報告があり、いずれもリグニン量の減少を報告している。また、Sewalt らは、同時に C4H のダウンレギュレーションによるリグニン量の減少についても報告している¹²⁰⁾。CCR のタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) におけるダウンレギュレーションは、Piquemal らによって報告されたが、リグニン量は減少したものの、形質転換体の成育が抑制されたと報告されている¹²¹⁾。

なお、最近 Kawaoka ら¹²²⁾は、フェニルプロパノイド生合成系の酵素の遺伝子発現における *cis* エレメントである Pal-box に結合するタンパク (Ntlm1) の cDNA をタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Petit

Havana SR-1) からクローニングし、その機能を調べている。すなわち、Ntlim1 の発現をアンチセンス法で抑えた形質転換タバコ (*N. tabacum* cv. Petit Havana SR-1) では、PAL, 4CL および CAD の活性が顕著に低下し、リグニン量も、コントロールに対して27%の減少をみた。

4. お わ り に

1994年に黒田は、当時のケイヒ酸経路の研究状況について、「……アンチセンス法を代表とするケイヒ酸経路の代謝制御は、水面下でかなり熾烈な競争が繰り広げられている。……中略……フェニルプロパノイド誘導体の生合成に関して、遺伝子に関する知見が急速に蓄積されはじめている。」と述べている⁵⁵⁾。実際、その後数年のうちに、これらの研究は次々と公表され、ケイヒ酸経路の諸酵素の機能に関する理解は格段に進んできた。すなわち、近年の分子生物学的手法の進歩がブレークスルーとなり、この分野の研究は大きく進展しており、1980年代のこの分野の進歩と比較するとまさに瞠目の感がある。そして、次の段階の課題としては、例えば、ケイヒ酸経路の代謝を統括して制御する因子の研究や、現在のケイヒ酸経路の研究が、双子葉植物におけるリグニン生合成に関するものが殆どであることから、その他の植物のケイヒ酸経路の研究もあげられる。なお、ケイヒ酸経路の研究の複雑さの1つは、多くの化合物群、すなわち、リグニンを始めとして、リグナン、ネオリグナン、ノルリグナン、フラボノイド、スチルベン、およびフェニルプロパノイドモノマー(クマリン等)の生合成が、この経路に重なって乗り入れていることに起因している。多くの場合、リグニンとフラボノイド以外の化合物の存在には十分な注意が払われずに、酵素の機能について論じられているようであるが、今後、ケイヒ酸経路の代謝について、例えばそのトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームについて詳細に検討する際には、これらリグニンおよびフラボノイド以外の化合物の時期および組織特異的な存在には十分注意を払うべきであろう。そして、植物化学的な知見や、酵素の細胞内局在に関する知見¹²³⁾を始めとして、ケイヒ酸経路の科学に関する総合的な知見のさらなる蓄積が、この経路の代謝工学の今後の研究の進展には不可欠と思われる。

引 用 文 献

- 1) 樋口隆昌：木材研究・資料, **No. 26**, 1-37 (1990)
- 2) 樋口隆昌：木質生化学, 文永堂出版 (1993)
- 3) J. KOUCOL and E.E. CONN: *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692-2698 (1961)
- 4) A.C. NEISH: *Phytochem.*, **1**, 1-24 (1961)
- 5) C. APPERT, E. LOGEMANN, K. HAHNBROCK, J. SCHMID and N. AMRHEIN: *Eur. J. Biochem.*, **225**, 491-499 (1994)
- 6) J. RÖSTER, F. KREKEL, N. AMRHEIN and J. SCHMID: *Plant Physiol.*, **113**, 175-179 (1997)
- 7) T. HIGUCHI: in "Discoveries in Plant Biology, Vol. II", S.-D. Kung and S.-H. Yang eds., World Scientific Publishing, Singapore, pp. 233-269 (1998)
- 8) D.W. RUSSELL: *J. Biol. Chem.*, **246**, 3870-3878 (1971)
- 9) J.R.M. POTTS, R. WEKLYCH and E.E. CONN: *J. Biol. Chem.*, **249**, 5019-5026 (1974)
- 10) B. GABRIAC, D. WERCK-REICHHART, H. TEUTSCH and F. DURST: *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 302-309 (1991)
- 11) M. MIZUTANI, E. WARD, J. DiMAIO, D. OHTA, J. RYALS and R. SATO: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 875-880 (1993)
- 12) H.G. TEUTSCH, M.P. HASENFRATZ, A. LESOT, C. STOLTZ, J.-M. GARNIER, J.-M. JELTSCH, F. DURST and D. WERCK-REICHHART: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4102-4106 (1993)
- 13) T. FAHRENDORF and R.A. DIXON: *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 509-515 (1993)
- 14) M. HOTZE, G. SCHRÖDER and J. SCHRÖDER: *FEBS Lett.*, **374**, 345-350 (1995)
- 15) S. KAWAI, A. MORI, T. SHIOKAWA, S. KAJITA, Y. KATAYAMA and N. MOROHOSHI: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1586-1597 (1996)

- 16) P.F.T. VAUGHAN and V.S. BUTT: *Biochem J.*, **113**, 109-115 (1969)
- 17) M. KOJIMA and W. TAKEUCHI: *J. Biochem.*, **105**, 265-270 (1989)
- 18) J.M. BONIWELL and V.S. BUTT: *Z. Naturforsch.*, **41c**, 56-60 (1986)
- 19) J. KAMSTEEG, J. VAN BREDERODE, P.M. VERSCHUREN and G. VAN NIGTEVECHT: *Z. Pflanzenphysiol.*, **102**, 435-442 (1981)
- 20) R.E. KNEUSEL, U. MATERN and K. NICOLAY: *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**, 455-462 (1989)
- 21) Z.-X. WANG, S.-M. LI, R. LÖSCHER and L. HEIDE: *Arch. Biochem. Biophys.*, **347**, 249-255 (1997)
- 22) M. TANAKA and M. KOJIMA: *Arch. Biochem. Biophys.*, **284**, 151-157 (1991)
- 23) W. HELLER and T. KÜHN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 453-460 (1985)
- 24) M. PETERSEN: *Phytochem.*, **45**, 1165-1172 (1997)
- 25) K. OSAKABE, C.C. TSAO, L. LI, J.L. POPKO, T. UMEZAWA, D.T. CARRAWAY, R.H. SMELTZER, C.P. JOSHI and V.L. CHIANG: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8955-8960 (1999)
- 26) L. LI, J.L. POPKO, T. UMEZAWA and V.L. CHIANG: *J. Biol. Chem.*, **275**, 6537-6545 (2000)
- 27) C. GRAND: *FEBS Lett.*, **169**, 7-11 (1984)
- 28) K. MEYER, J.C. CUSUMANO, C. SOMERVILLE and C.C.S. CHAPPLE: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6869-6874 (1996)
- 29) R.L. MANSELL, J. STÖCKIGT and M.H. ZENK: *Z. Pflanzenphysiol.*, **68**, 286-288 (1972)
- 30) G.G. GROSS, J. STÖCKIGT, R.L. MANSELL and M.H. ZENK: *FEBS Lett.*, **31**, 283-286 (1973)
- 31) J. STÖCKIGT, R.L. MANSELL, G.G. GROSS and M.H. ZENK: *Z. Pflanzenphysiol.*, **70**, 305-307 (1973)
- 32) J. EBEL and H. GRISEBACH: *FEBS Lett.*, **30**, 141-143 (1973)
- 33) S.A. BROWN and A.C. NEISH: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2419-2424 (1959)
- 34) G.G. GROSS: *Rec. Adv. Phytochem.*, **11**, 141-184 (1977)
- 35) H. KUTSUKI, M. SHIMADA and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **21**, 267-271 (1982)
- 36) I. KAWAMURA, Y. SHINODA, T.V. AI and T. TANADA: *Mokuzai Gakkaishi*, **23**, 400-404 (1977)
- 37) H. KUTSUKI and T. HIGUCHI: *Mokuzai Gakkaishi*, **24**, 625-631 (1978)
- 38) C. GRAND, A. BOUDET and A.M. BOUDET: *Planta*, **158**, 225-229 (1983)
- 39) H. MENG and W.H. CAMPBELL: *Phytochem.*, **44**, 605-608 (1997)
- 40) K. INOUE, V.J.H. SEWALT, G.M. BALLANCE, W. NI, C. STÜRZER and R.A. DIXON: *Plant Physiol.*, **117**, 761-770 (1998)
- 41) K. FUKUSHIMA and N. TERASHIMA: *J. Wood Chem. Technol.*, **10**, 413-433 (1990)
- 42) N. TERASHIMA, K. FUKUSHIMA, S. TSUCHIYA and K. TAKABE: *J. Wood Chem. Technol.*, **6**, 495-504 (1986)
- 43) N. TERASHIMA, K. FUKUSHIMA and K. TAKABE: *Holzforschung*, **40(Suppl.)**, 101-105 (1986)
- 44) J.H. CHRISTENSEN, M. BAUCHER, A. O'CONNELL, M. VAN MONTAGU and W. BOERJAN: in "Molecular Biology of Woody Plants, Vol. 1", S.M. Jain and S.C. Minocha eds., Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 227-267 (2000)
- 45) D. LEE, K. MEYER, C. CHAPPLE, and C.J. DOUGLAS: *Plant Cell*, **9**, 1985-1998 (1997)
- 46) D. LEE and C.J. DOUGLAS: *Plant Physiol.*, **112**, 193-205 (1996)
- 47) H. WENGENMAYER, J. EBEL and H. GRISEBACH: *Eur. J. Biochem.*, **65**, 529-536 (1976)
- 48) F. SARNI, C. GRAND and A.M. BOUDET: *Eur. J. Biochem.*, **139**, 259-265 (1984)
- 49) T. LÜDERITZ and H. GRISEBACH: *Eur. J. Biochem.*, **119**, 115-124 (1981)
- 50) E. LACOMBE, S. HAWKINS, J. VAN DOORSSELAERE, J. PIQUEMAL, D. GOFFNER, O. POEYDOMENGE, A.-M. BOUDET and J. GRIMA-PETTENATI: *Plant J.*, **11**, 429-441 (1997)
- 51) R.L. MANSELL, G.G. GROSS, J. STÖCKIGT, H. FRANKE and M.H. ZENK: *Phytochem.*, **13**, 2427-2435 (1974)
- 52) D. WYRAMBIK and H. GRISEBACH: *Eur. J. Biochem.*, **59**, 9-15 (1975)
- 53) H. KUTSUKI, M. SHIMADA and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **21**, 19-23 (1982)
- 54) T. HIBINO, D. SHIBATA, T. UMEZAWA and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **32**, 565-567 (1993)
- 55) 黒田宏之, 木質分子生物学 (樋口隆昌編) 文永堂出版, pp. 109-140 (1994)
- 56) M.E. KNIGHT, C. HALPIN and W. SCHUCH: *Plant Mol. Biol.*, **19**, 793-801 (1992)
- 57) D.M. O'MALLEY, S. PORTER and R.R. SEDEROFF: *Plant Physiol.*, **98**, 1364-1371 (1992)
- 58) T. HIBINO, D. SHIBATA, J.-Q. CHEN and T. HIGUCHI: *Plant Cell Physiol.*, **34**, 659-665 (1993)
- 59) B.J. FINKLE and R.F. NELSON: *Biochim. Biophys. Acta*, **78**, 747-749 (1963)

- 60) B.J. FINKLE and M.S. MASRI: *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 167-169 (1964)
- 61) D. HESS: *Z. Pflanzenphysiol.*, **53**, 460-463 (1965)
- 62) T. HIGUCHI, M. SHIMADA and H. OHASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1459-1465 (1967)
- 63) M. SHIMADA, H. OHASHI and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **9**, 2463-2470 (1970)
- 64) M. SHIMADA and T. HIGUCHI: *Wood Res.*, **No. 50**, 19-28 (1970)
- 65) M. SHIMADA, H. FUSHIKI and T. HIGUCHI: *Mokuzai Gakkaishi*, **18**, 43-44 (1972)
- 66) M. SHIMADA, H. FUSHIKI and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **11**, 2657-2662 (1972)
- 67) M. SHIMADA, H. FUSHIKI and T. HIGUCHI: *Mokuzai Gakkaishi*, **19**, 13-21 (1973)
- 68) H. KURODA: *Wood Res.*, **No. 69**, 91-135 (1983)
- 69) M. SHIMADA, H. KURODA and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **12**, 2873-2875 (1973)
- 70) H. KURODA, M. SHIMADA and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **14**, 1759-1763 (1975)
- 71) H. KURODA, M. SHIMADA and T. HIGUCHI: *Phytochem.*, **20**, 2635-2639 (1981)
- 72) J.E. POULTON and V.S. BUTT: *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 301-314 (1975)
- 73) J. POULTON, H. GRISEBACH, J. EBEL, B. SCHALLER-HEKELER and K. HAHNBROCK: *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 301-305 (1976)
- 74) J. POULTON, K. HAHNBROCK and H. GRISEBACH: *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 449-456 (1976)
- 75) R.C. BUGOS, V.L.C. CHIANG and W.H. CAMPBELL: *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1203-1215 (1991)
- 76) C.P. JOSHI and V.L. CHIANG: *Plant Mol. Biol.*, **37**, 663-674 (1998)
- 77) H. KUTSUKI: Ph.D. Thesis (Kyoto University) (1981)
- 78) H. KUTSUKI, F. NAKATSUBO and T. HIGUCHI: unpublished results (1981)
- 79) T. HIGUCHI: in "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components", T. Higuchi ed., Academic Press, Orlando, pp. 141-160 (1985)
- 80) U. MATERN and R.E. KNEUSEL: *Phytoparasitica*, **16**, 153-170 (1988)
- 81) A.-E. PAKUSCH, R.E. KNEUSEL and U. MATERN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**, 488-494 (1989)
- 82) T. KÜHNEL, U. KOCH, W. HELLER and E. WELLMANN: *Plant Sci.*, **60**, 21-25 (1989)
- 83) A.-E. PAKUSCH, U. MATERN and E. SCHILTZ: *Plant Physiol.*, **95**, 137-143 (1991)
- 84) A.-E. PAKUSCH and U. MATERN: *Plant Physiol.*, **96**, 327-330 (1991)
- 85) D. SCHMITT, A.-E. PAKUSCH and U. MATERN: *J. Biol. Chem.*, **266**, 17416-17423 (1991)
- 86) Z.-H. YE, R.E. KNEUSEL, U. MATERN and J.E. VARNER: *Plant Cell*, **6**, 1427-1439 (1994)
- 87) Z.-H. YE and J.E. VARNER: *Plant Physiol.*, **108**, 459-467 (1995)
- 88) Z.-H. YE: *Plant Physiol.*, **115**, 1341-1350 (1997)
- 89) L. LI, Y. OSAKABE, C.P. JOSHI and V.L. CHIANG: *Plant Mol. Biol.*, **40**, 555-565 (1999)
- 90) L. LI, J.L. POPKO, X.-H. ZHANG, K. OSAKABE, C.-J. TSAI, C.P. JOSHI and V.L. CHIANG: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5461-5466 (1997)
- 91) H. MENG and W.H. CAMPBELL: *Plant Mol. Biol.*, **38**, 513-520 (1998)
- 92) G. BUSAM, K.T. JUNGHANNS, R.E. KNEUSEL, H.-H. KASSEMAYER and U. MATERN: *Plant Physiol.*, **115**, 1039-1048 (1997)
- 93) F. MARTZ, S. MAURY, G. PINÇON and M. LEGRAND: *Plant Mol. Biol.*, **36**, 427-437 (1998)
- 94) B. GRIMMIG, R.E. KNEUSEL, K.T. JUNGHANNS and U. MATERN: *Plant Biol.*, **1**, 299-310 (1999)
- 95) S. MAURY, P. GEOFFROY and M. LEGRAND: *Plant Physiol.*, **121**, 215-223 (1999)
- 96) U.N. DWIVEDI, W.H. CAMPBELL, J. YU, R.S.S. DATLA, R.C. BUGOS, V.L. CHIANG and G.K. PODILA: *Plant Mol. Biol.*, **26**, 61-71 (1994)
- 97) W. NI, N.L. PAIVA and R.A. DIXON: *Transgenic Res.*, **3**, 120-126 (1994)
- 98) V.J.H. SEWALT, W. NI, H.G. JUNG and R.A. DIXON: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1977-1983 (1997)
- 99) J. VAN DOORSSELAERE, M. BAUCHER, E. CHOIGNOT, B. CHABBERT, M.-T. TOLLIER, M. PETIT-CONIL, J.-C. LEPLÉ, G. PILATE, D. CORNU, B. MONTIES, M. VAN MONTAGU, D. INZÉ, W. BOERJAN and L. JOUANIN: *Plant J.*, **8**, 855-864 (1995)
- 100) C.-J. TSAI, J.L. POPKO, M.R. MIELKE, W.-J. HU, G.K. PODILA and V.L. CHIANG: *Plant Physiol.*, **117**, 101-112 (1998)
- 101) R. ATANASSOVA, N. FAVET, F. MARTZ, B. CHABBERT, M.-T. TOLLIER, B. MONTIES, B. FRITIG and M. LEGRAND: *Plant J.*, **8**, 465-477 (1995)

- 102) R. ZHONG, W.H. MORRISON III, J. NEGREL and Z.-H. YE: *Plant Cell.*, **10**, 2033-2045 (1998)
- 103) R. ZHONG, W.H. MORRISON III, D.S. HIMMELSBACH, F.L. POOLE II and Z.-H. YE: *Plant Physiol.*, **124**, 563-577 (2000)
- 104) J.M. HUMPHREYS, M.R. HEMM and C. CHAPPLE: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10045-10050 (1999)
- 105) K. MEYER, A.M. SHIRLEY, J.C. CUSUMANO, D.A. BELL-LELONG and C. CHAPPLE: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6619-6623 (1998)
- 106) F. CHEN, S. YASUDA and K. FUKUSHIMA: *Planta*, **207**, 597-603 (1999)
- 107) C. GRAND, P. PARMENTIER, A. BOUDET and A.M. BOUDET: *Physiol. Vég.*, **23**, 905-911 (1985)
- 108) F. VIGNOLS, M.A. TORRES, M. CAPELLADES and P. PUIGDOMÈNECH: *Plant Cell.*, **7**, 407-416 (1995)
- 109) C. PILLONEL, M.M. MULDER, J.J. BOON, B. FORSTER and A. BINDER: *Planta*, **185**, 538-544 (1991)
- 110) W.-J. HU, A. KAWAOKA, C.-J. TSAI, J. LUNG, K. OSAKABE, H. EBINUMA and V.L. CHIANG: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5407-5412 (1998)
- 111) W.-J. HU, S.A. HARDING, J. LUNG, J.L. POPKO, J. RALPH, D.D. STOKKE, C.-J. TSAI and V.L. CHIANG: *Nature Biotech.*, **17**, 808-812 (1999)
- 112) S. KAJITA, Y. KATAYAMA and S. OMORI: *Plant Cell Physiol.*, **37**, 957-965 (1996)
- 113) S. KAJITA, S. HISHIYAMA, Y. TOMIMURA, Y. KATAYAMA and S. OMORI: *Plant Physiol.*, **114**, 871-879 (1997)
- 114) C. HALPIN, M.E. KNIGHT, G.A. FOXON, M.M. CAMPBELL, A.M. BOUDET, J.J. BOON, B. CHABBERT, M.-T. TOLLIER and W. SCHUCH: *Plant J.*, **6**, 339-350 (1994)
- 115) T. HIBINO, K. TAKABE, T. KAWAZU, D. SHIBATA and T. HIGUCHI: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 929-931 (1995)
- 116) M. BAUCHER, B. CHABBERT, G. PILATE, J. VAN DOORSSELAERE, M.-T. TOLLIER, M. PETIT-CONIL, D. CORNU, B. MONTIES, M. VAN MONTAGU, D. INZÉ, L. JOUANIN and W. BOERJAN: *Plant Physiol.*, **112**, 1479-1490 (1996)
- 117) T. HIGUCHI, T. ITO, T. UMEZAWA, T. HIBINO and D. SHIBATA: *J. Biotechnol.*, **37**, 151-158 (1994)
- 118) Y. ELKIND, R. EDWARDS, M. MAVANDAD, S.A. HEDRICK, O. RIBAK, R.A. DIXON and C.J. LAMB: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9057-9061 (1990)
- 119) N.J. BATE, J. ORR, W. NI, A. MEROMI, T. NADLER-HASSAR, P.W. DOERNER, R.A. DIXON, C.J. LAMB and Y. ELKIND: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7608-7612 (1994)
- 120) V.J.H. SEWALT, W. NI, J.W. BLOUNT, H.G. JUNG, S.A. MASOUD, P.A. HOWLES, C. LAMB and R.A. DIXON: *Plant Physiol.*, **115**, 41-50 (1997)
- 121) J. PIQUEMAL, C. LAPIERRE, K. MYTON, A. O'CONNELL, W. SCHUCH, J. GRIMA-PETTENATI and A.-M. BOUDET: *Plant J.*, **13**, 71-83 (1998)
- 122) A. KAWAOKA, P. KAOTHEN, K. YOSHIDA, S. ENDO, K. YAMADA and H. EBINUMA: *Plant J.*, **22**, 289-301 (2000)
- 123) J. NAKASHIMA, T. AWANO, K. TAKABE, M. FUJITA and H. SAIKI: *Plant Cell Physiol.*, **38**, 113-123 (1997)